

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIA TEADUSKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
BIOTEHNOLOOGIA ÕPPETOOL

Kristiina Hein

Kolmanda põlvkonna sekveneerimistehnoloogiad

Bakalaureusetöö

Juhendaja prof. Ants Kurg, Ph.D

Tartu 2014

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID	3
SISSEJUHATUS	4
KIRJANDUSE ÜLEVAADE	5
1. ESIMESE PÕLVKONNA SEKVenEERIMISTEHNOLoOGIAD	5
2. TEISE PÕLVKONNA SEKVenEERIMISTEHNOLoOGIAD	6
3. TEISE JA KOLMANDA PÕLVKONNA VAHEETAPP	10
4. KOLMANDA PÕLVKONNA SEKVenEERIMISTEHNOLoOGIAD	12
4.1 <i>Sünteesi kaudu sekveneerimine</i>	13
4.1.1 PacBio esimene de novo eukarüoodi genoom	16
4.1.2 SMRT tehnoloogia eelised ja puudused	16
4.2 <i>DNA sekveneerimine nanopooridega</i>	18
4.2.1 Oxford Nanopore Technologies	19
4.2.2 Tag Nanopore	22
4.2.3 Quantum Biosystems	25
ARUTELU	27
KOKKUVÕTE	30
SUMMARY	31
TÄNUAVALDUSED	32
KASUTATUD KIRJANDUS	33
KASUTATUD VEEBIAADRESSID	36

KASUTATUD LÜHENDID

ddNTP - didesoksünukleotiid (*dideoxynucleotide*)

PCR - polümeraasi ahelreaktsioon (*polymerase chain reaction*)

SNP - üksiku nukleotiidi polümorfism (*single-nucleotide polymorphism*)

SBS - sünteesi teel sekveneerimine (*sequencing by synthesis*)

SMRT - üksikmolekuli reaajajas sekveneerimine (*single molecule real-time sequencing*)

AFM - aatomijõu mikroskoopia (*atomic force microscopy*)

ZMW - *Zero-Mode Waveguide*

BAC - bakteri kunstlik kromosoom (*bacterial artificial chromosome*)

NHGRI - USA Riiklik Inimgenoomi Uuringute Instituut (*National Human Genome Research Institute*)

HGP - Inimese Genoomi Projekt (*Human Genome Project*)

SISSEJUHATUS

Sekveneerimine on meetod, milles tehakse kindlaks monomeeride järjestused erinevates informatsioonilistes biopolümeerides. Kõige sagedamini kasutatakse sekveneerimist DNA puhul, mis võimaldab järjestada genoomis olevaid nukleotiide ning anda meile informatsiooni antud elusorganismi funktsiooni ja struktuuride kohta. Antud järjestused on olulised vahendid nii teaduslikes kui ka meditsiinilistes uuringutes.

Esimese põlvkonna ehk Sangeri tehnoloogia töötati välja mitukümmend aastat tagasi ning see on olnud suureks läbimurdeks terves geenitehnoloogias. Vaatamata selle laiale kasutusele ka tänapäeval, on tehnoloogial hulgaliselt puudusi, mis andis tõuke kiiremate ja lihtsamate meetodite arendamiseks. Teise generatsiooni tehnoloogia keskendub põhiliselt paralleelselt tuhandete molekulide sekveneerimisele. Kuigi uue tehnoloogia läbilaskevõime oli suur, siis lugemite pikkus jäi eelmisele põlvkonnale kõvasti alla. Kolmanda põlvkonna tehnoloogia pealetulekuga pidi aga muutuma kogu eelnev sekveneerimise põhimõte. Antud põlvkonda ehk reaalajas sekveneerimist iseloomustab üksikmolekuli järjestamine, kus ei kasutata enam DNA eelnevat paljundamist vaid üritatakse erinevate meetoditega lugeda DNA järjestust otse reaalajas. Uute tehnoloogiate välja kuulutamise ja patenteerimisega erinevate firmade poolt algas justkui biotehnoloogia „võidurelvastamine“, kuid vaid mõned üksikud jõudsid oma sõnadest kaugemale ja tõid turule lubatud sekveneerimismasinad.

Antud bakalaureusetöö eesmärgiks on tutvustada lühidalt kõiki sekveneerimise põlvkondi. Põhirõhuks on kirjandusallikate põhjal pikemalt analüüsida ja kirjeldada kolmanda põlvkonna tehnoloogiaid. Töös antakse ülevaade juba eksisteerivatest sekveneerimisplatvormidest ning veel tehnoloogiatest, mis ei ole turule jõudnud. Samuti tuuakse välja kolmanda põlvkonna sekveneerimistehnoloogiate eelised ning puudused.

Töö on koostatud Tartu Ülikooli Molekulaar- ja Rakubioloogia Instituudi biotehnoloogia õppetoolis.

Märksõnad: sekveneerimine, SMRT, nanopoor

KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1. ESIMESE PÕLVKONNA SEKVENEERIMISTEHNOLOOGIAD

DNA primaarstruktuuri järjestamise ehk sekveneerimistehnoloogia sai alguse 1975. aastal, kui Friedrich Sanger arendas välja DNA ahela sünteesi terminatsiooni meetodika, mida hakati hiljem tema nime järgi kutsuma Sangeri sekveneerimiseks. Samal ajal tegelesid Allan Maxam ja Walter Gilbert keemilise sekveneerimise ehk mittetäieliku keemilise lagundamise tehnoloogia väljaarendamisega, mis tollel ajal oli molekulaarbioloogide käes samuti oluliseks töövahendiks, kuid langes aja jooksul kasutusest oma tehnilise keerukuse ja ohtlikkuse tõttu. Vaatamata sellele, jagasid nii Gilbert kui ka Sanger 1980. aastal Nobeli keemia preemiat, milles tunnustati mõlema panust nukleiinhapete järjestuste määramisel. Sangeri sekveneerimine, mida tänapäeval nimetatakse ka esimese põlvkonna sekveneerimiseks, kujutab endast didesoksünukleotiidide (ddNTP) ehk terminaatorite, millel puudub 3' positsioonis OH rühm, kasutamist. Ahela terminatsioon ddNTP poolt toimub DNA polümeraasi töö käigus, mille jooksul polümeriseeritakse nukleotiidid DNA sünteesil komplementaarselt teatud DNA maatriksile. Selle protsessi käigus tekivad DNA fragmendid, mille pikkus vastab iga nukleotiidi kaupa DNA järjestusele, mille määramiseks lahutatakse need fragmendid geleelektroforeesil (Sanger jt., 1977). Alguses kasutati selleks poliüakrüülamiid-uurea geeli kuid tänapäeval enamasti automatiseeritud kapillaarelektroforeesi spetsiaalsete geelide abil. Eelnimetatud meetod võimaldab genereerida keskmiselt kuni 800 nukleotiidi pikkuseid DNA fragmente (Hert jt., 2008). Sangeri sekveneerimine annab suhteliselt täpse tulemuse ning tehnoloogia on automatiseerimise tõttu kergesti teostatav. Meetod sobib ideaalselt lühikeste DNA fragmentide sekveneerimiseks, kuid näiteks inimese genoomis on umbes 3 miljardit aluspaari ja selle sekveneerimine nõuaks tohutult palju aega ning eeltööd. Sellele vaatamata kasutati inimese genoomi esmakordsel järjestamisel antud tehnoloogiat (Schadt jt., 2010; Adams 2008).

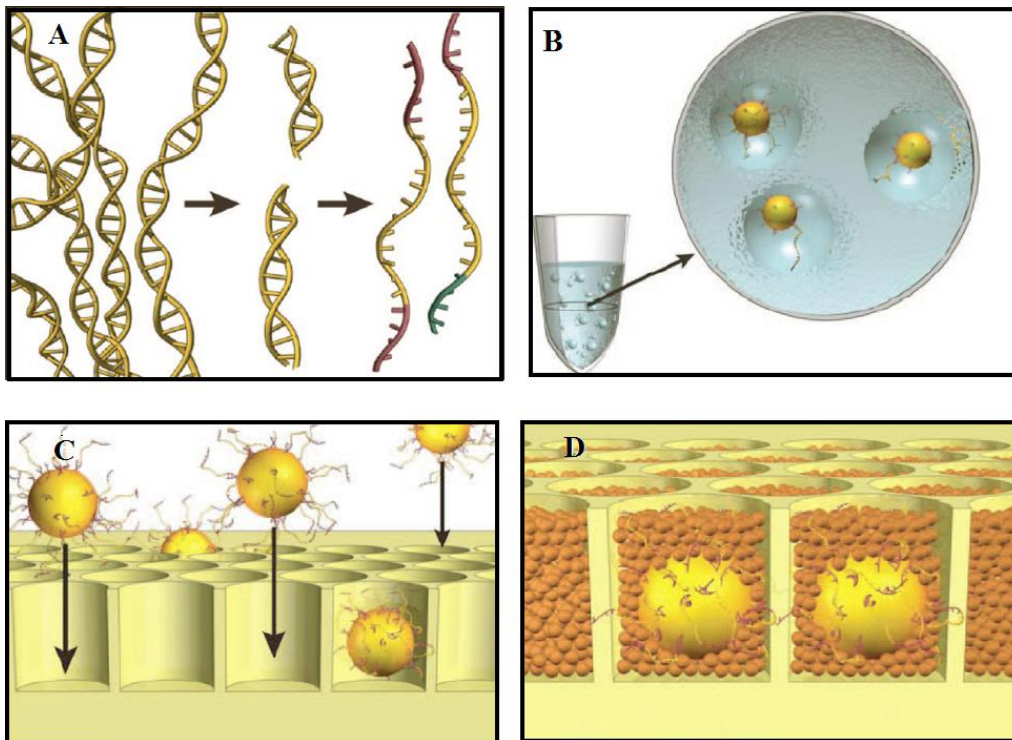
Tänapäeval on Sangeri sekveneerimine endiselt väga laialdases kasutuses. Uute tehnoloogiate pealetulekule vaatamata peetakse Sangeri sekveneerimist „kuldseks standardiks“, mis on ja jääb oluliseks osaks erinevates valdkondades, millest kliiniline molekulaardiagnostika moodustab suure osa. Näiteks üksikute mutatsioonide tuvastamine genoomis on kõige lihtsam just eelnimetatud meetodiga (<http://arup.utah.edu/education/sanger.php>).

2. TEISE PÕLVKONNA SEKVENEERIMISTEHNOLOOGIAD

2005. aastal hakati rääkima uuest sekveneerimistehnoloogiast, mis pidi lahendama kõik Sangeri meetodil esinevad probleemid: kõrge hind ja suhteliselt vähe informatsiooni. Uut meetodit hakati nimetama teise ehk järgmise põlvkonna sekveneerimiseks. Seda iseloomustavad platvormid, mis toodavad suures koguses (tavaliselt miljoneid) lühikesi DNA järjestusi, mille pikkused jäävad 25 ja 400 aluspaari vahele. Uus tehnoloogia võimaldab järjestada paralleelselt suurt hulka DNA molekule (Schadt jt., 2010; Imelfort ja Edwards, 2009).

Esimeseks turule jõudnud teise põlvkonna sekveneerimise tehnoloogiaks sai pürosekveneerimine, ning esimese eduka süsteemi töötas välja 454 Life Sciences (Branford, CT, USA), mida hakkas tootma firma Roche. Selle masina esimene tööstuslik versioon GS20 oli võimeline järjestama üle 20 miljoni aluspaari veidi enam kui 4 tunniga. Masin GS20 vahetus 2007 aastal välja uue mudeli vastu, milleks sai GS FLX. Uus versioon suutis sekveneerida üle 100 miljoni aluspaari suhteliselt sama ajaga (Margulies jt., 2005). Antud meetod põhineb pürosekveneerimisel, mis toimub DNA sünteesi käigus, mille läbiviivaks ensüümiks on DNA polümeraas. Uuritava DNA paljundamiseks kasutab see tehnoloogia emulsioon-PCR meetodit. Reaktsiooni keskkonnaks on veetilga sarnane emulsioon, kus iga üksikus tilgas paljundatakse ühte DNA lõiku. Erinevalt Sangeri meetodist ei toimu siin sünteesitava DNA ahela terminatsiooni ddNTP-de abil, vaid iga nukleotiidi lisandumisel uude ahelasse vabaneb pürofosfaat (Joonis 1). Pürofosfaat on substraadiks erinevate reaktsioonide toimumiseks, mille tulemusel vabaneb valguskiirgus, mis registreeritakse ja tänu millele saab lõpuks järjestada terve ahela (Imelfort ja Edwards, 2009).

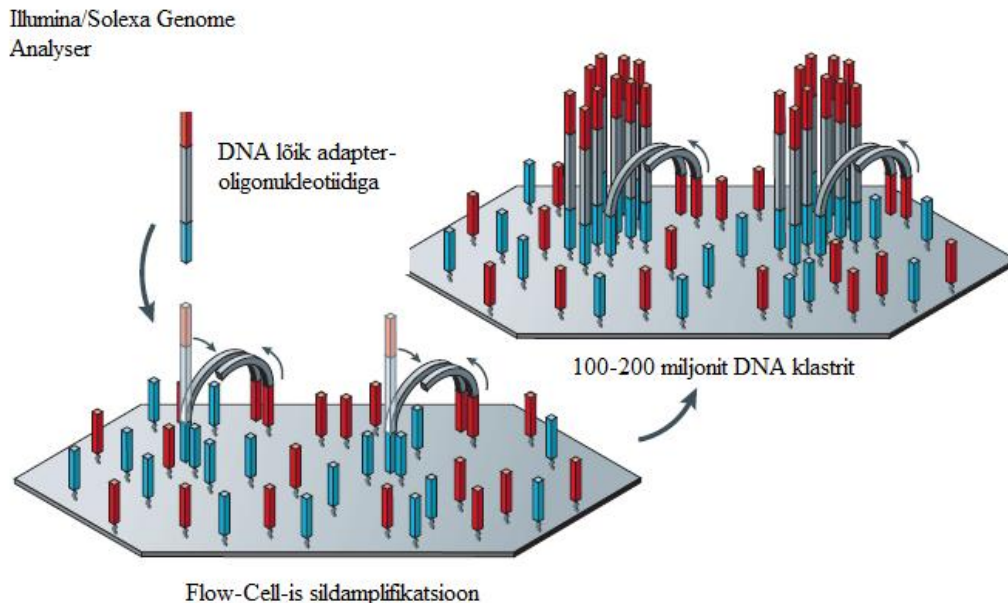
Eelmise aasta lõpus teatas firma Roche, et lõpetatakse antud platvormil põhinevate instrumentide tootmine ja 2016. aastaks on plaan lõpetada ka olemasolevate tehniline toetamine.



Joonis 1. Pürosekveneeringimine Roche platvormi abil. **A.** Eraldatakse genoomne DNA, ligeeritakse adapterid ja eraldatakse üksikahel. **B.** Fragmentid liidetakse pisikestele mikrokuulikestele ning PCR toimub õlitilga sees. **C.** Õlitilgad lõhutakse, DNA denatureeritakse ning üheaahelalist DNA-d kandvad mikrokuulikesed suletakse fiiberoptilise slaidi “aukudesse”. **D.** Aukudesse lisatakse ensüümid ning muu reaktsiooniks vajalik ning toimub sekveneeringimine (Margulies jt., 2005).

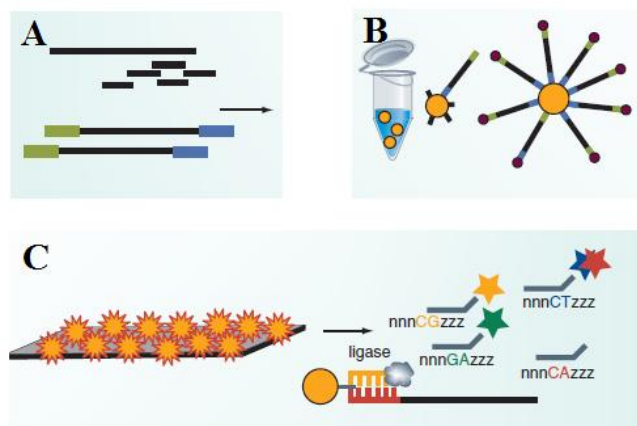
Lisaks Roche GS FLX masinale oli veel kaks alternatiivset ülikõrge läbilaskvusega sekveneeringimissüsteemi. Üheks oli Applied Biosystems'i (Foster City, CA, USA) poolt toodetud SOLiD ja teiseks Solexa Genome Analyser tehnoloogia Illumina Inc. (San Diego, CA, USA) poolt. Illumina Solexa tehnoloogia puhul algab töö genoomse DNA fragmenteerimisega ultraheli vahendusel, mille tulemusel saadakse suhteliselt ühtlase pikkusega DNA järjestuste segu. Seejärel liidetakse nende DNA lõikude otstes adapter-oligonukleotiidid ja puhastatakse. Nüüd järgneb DNA amplifitseerimine, mis Illumina platvormi puhul toimub tahkele kandjale seotult. Selleks kasutatakse nn. Flow-Cell-i, kus paiknevad adapteritega komplementaarsed oligonukleotiidid, millele liidetakse DNA fragmentid. Sildamplifikatsiooni tulemusena tekivad Flow-Cell põhja identse järjestustega DNA klastrid (Joonis 2). Sekveneeringimiseks kasutatakse eemaldatava fluorestsentsmärgiga terminaatornukleotiidide ja vastavat DNA polümeraasi. Ühe sekveneeringimise tsükli kohta liidetakse üks komplementaarne nukleotiid, loetakse ära sellega seotud fluorestsentsmärke

ning siis eemaldatakse antud fluorofoor ja blokaatorgrupp. Blokaatorgrupi olemasolu on äärmiselt tähtis, kuna muidu liituks tsükli kohta rohkem kui üks nukleotiid ja identifitseerimine oleks väga raske. Tsükkel kordub kuni terve DNA lõik on nukleotiidide kaupa sekveneeritud. Illumina tehnoloogia puhul on sekveneerimise usaldusväärseks läbiviimiseks on tarvis vähemalt 10-kordset kattuvust nukleotiidi kohta (Huang jt., 2009; Imelfort ja Edwards, 2009).



Joonis 2. Illumina sildamplifikatsioon. (Metzker, 2010)

2006 aastal tuli firma Life Technologies-i poolt turule SOLiD (ingl k. *Sequencing by Oligonucleotide Ligation and Detection*) tehnoloogia. Selle tööpõhimõte seisneb sünkroonsetes ligeerimistsüklites. Sarnaselt pürosekveneerimisele kasutab SOLiD tehnoloogia DNA amplifitseerimiseks emulsioon-PCR meetodit. DNA fragmentide raamatukogu valmistatakse mikrokuulidel. PCR-i lõpptulemusena on iga kuulike kaetud tuhandete koopiatega algsest fragmendist. Seejärel vastavalt rakendusele asetatakse kuulid klaaspinnale. Fluorestsentsvalgus eraldub alles siis kui üksikahel ligeeritakse olemasoleva fragmendiga. SOLiD kasutab samuti nelja värviga fluorestsentsmarkeerimist, et kaardistada võimalike nukleotiidide kombinatsioone (Joonis 3). Süsteem on võimeline identifitseerima üksikahelates erinevaid insertioone, deletsioone ning ühenukleotiidilisi polümorfisme, SNP-sid (*single nucleotide polymorphisms*) (Natrajan ja Reis-Filho, 2011; Imelfort ja Edwards, 2009; <https://www.youtube.com/user/ImGenTechWPI>).

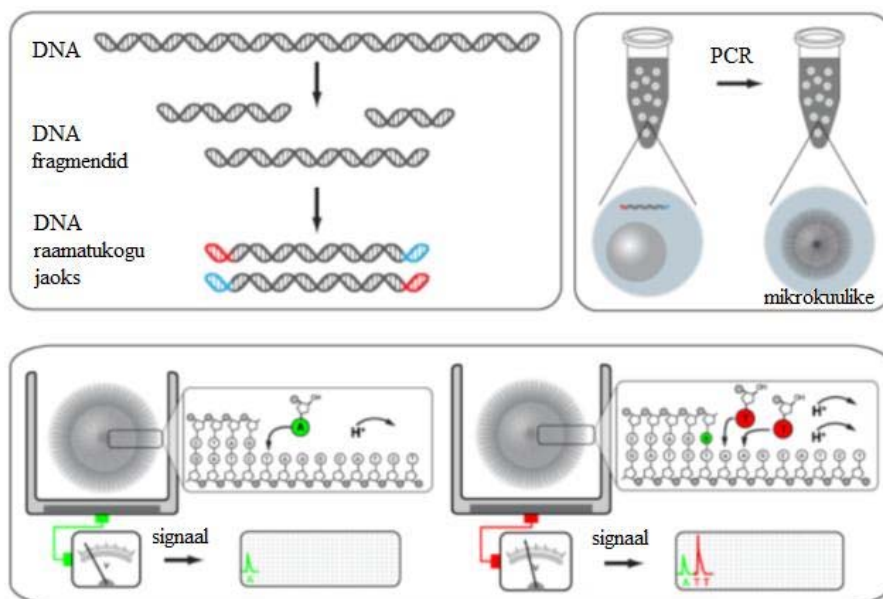


Joonis 3. SOLiD-i sekveneermine. (Natrajan ja Reis-Filho, 2011).

3. TEISE JA KOLMANDA PÕLVKONNA VAHEETAPP

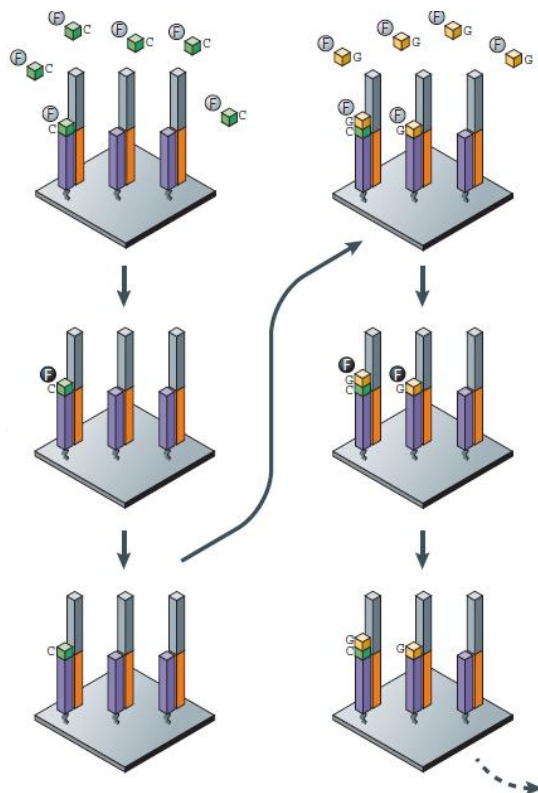
Lisaks ülalkirjeldatule jääb teise ja kolmanda põlvkonna vahele veel üks meetodite klass, kuna ei jõutud üksmeelele, millele keskenduda kolmanda põlvkonna tehnoloogias. Siin kasutatakse endiselt „pesemise ja skaneerimise“ meetodit ning samuti on vajalik PCRi amplifikatsioon DNA paljundamiseks. Sellesse generatsiooni kuuluvad masinad nimega Ion Torrent's (tänapäeval Life Technologies) ja Helicos Genetic Analysis Platform (Schadt jt., 2010).

Ion Torrent'i tehnoloogias kasutatakse DNA järjestuse lugemiseks pooljuhist kiipi, mis muudab geneetilise info digitaalselt loetavaks. Protsess algab genoomse DNA lõhkumisega miljoniteks fragmentideks. Seejärel seotakse kõik DNA fragmendid teatud mikrokuulikestele, kusjuures püütakse saavutada olukord, et ühel kuulikesel on ainult ühesugused DNA järjestused, mida amplifitseeritakse kuni kuul on täielikult kaetud. Need kuulikesed liiguvad seejärel kiibi sees olevatesse pisikestesse aukudesse, mis kaetakse ühekaupa järjekorras nukleotiididega. Iga kord kui nukleotiid ühineb komplementaarse järjestusega DNA fragmendiga kuulikese pinnal, vabaneb sellest vesinikioon (H^+). Vesinikioon muudab „augu“ pH-d, see muudetakse elektrivooluks, mida saab registreerida ja vastavalt sellele märgitakse õige nukleotiid andmebaasi (Joonis 4). Ion Torrenti puhul kasutatakse endiselt PCRi ning pesu, kuid puudub fluorestsentsmärgete ja nende detektsiooni kasutamine. Seetõttu nimetatakse antud tehnoloogiat ka „post-light“ tehnoloogiaks (Ozsolak, 2012; Schadt jt., 2010).



Joonis 4. Ion Torrent tehnoloogia. (<http://www.genomics.cn/en/index>).

Helicos Genetic Analysis Platform sarnanes rohkem juba kolmanda põlvkonna masinatele, kuna teostas ühe DNA molekuli sekveneerimistehnoloogiat (*single molecule DNA sequencing technologies*). Selle puhul ei kasutata enam DNA paljundamist PCR-i abil vaid üritatakse erinevate meetodite abil lugeda DNA järjestust otse reaajas. Kõigepealt lõigatakse DNA 100-200 nukleotiidi pikkusteks juppideks. Iga DNA lõigu 3' otsa lisatakse poly(A) saba ning märgistatakse ja blokeeritakse terminaalne transferaasiga. Need DNA lõigud seonduvad siis hübridisatsiooni teel pinnaga, millel on eelnevalt kovalentselt seotud 5'dT (50) oligonukleotiidi (Harris jt., 2008). Kogu pind valgustatakse ning õigesti ühildunud DNA fragmendid tuvastatakse ning valmistatakse sünteesiks. Sellele järgneb pesemise ja skaneerimise protsess, mis sarnaneb teise põlvkonna tehnoloogiaga. Kogu pind ujutatakse üle märgistatud nukleotiididega ja polümeraasidega ning hiljem pestakse ebavajalik sünteesimaterjal maha. Skaneerimine toimub iga pesu järel, et detekteerida fluorestsentsiga nukleotide (Joonis 5). Helicos masinaid saab kasutada ka RNA sekveneerimiseks. Selles asendub DNA polümeraas pöördtranskriptaasiga ning mingisugust lisa tööd pole vaja teha. Kahjuks on firma Helicos oma halva majandusliku seisu tõttu tahaplaanile jäänud (Schadt jt., 2010).



Joonis 5. Helicos Genetic Analysis Platform-i sekveneerimine. (Metzker, 2010).

4. KOLMANDA PÕLVKONNA SEKVENEERIMISTEHNOLOOGIAD

Eelnevad sekveneerimistehnoloogiate puudused on viinud revolutsioonilistele muutustele terves geenitehnoloogia valdkonnas: uued hämmastavad teaduslikud edusammud, nende hulgas genoomi paremini mõistmine ja erinevad interaktsioonid, näiteks valkude ja DNA vahel. Selle kõige eesmärk on luua sekveneerimismasinaid, mis genereerivad pikemaid nukleotiidseid järjestusi kiirema ajaga ja taskukohasema hinnaga. Kolmanda põlvkonna ehk reaalaaja sekveneerimist iseloomustab üksikmolekuli järjestamine, kus ei kasutata enam DNA paljundamist PCR-i abil vaid üritatakse erinevate meetoditega lugeda DNA järjestust otse reaalaajas. Amplifikatsiooni etapita sekveneerimine aitab vältida DNA paljundamise käigus tekkivaid võimalikke vigu (Pareek jt., 2011).

Üksikmolekuli sekveneerimistehnoloogiaid võib jämedalt liigitada kolme eri kategooriasse:

- sünteesi kaudu sekveneerimise tehnoloogia (SBS, *sequencing by synthesis*), mille puhul jälgitakse DNA polümeraasi tööd üksikute nukleotiidide DNA ahelasse lülitamisel sünteesi ajal;
- nanopooride tehnoloogia, milles üksikud DNA molekulid on keerdunud läbi nanopoori või selle läheduses ning individuaalsed alused detekteeritakse kui nad nanopoori läbivad;
- üksikute DNA molekulide pildistamine erinevate mikroskoopia rakenduste, nagu näiteks aatomijõu mikroskoopia (*atomic force microscopy*- AFM) abil. Antud tehnoloogia on tänapäeval jäänud kõige rohkem idee tasandile ning siin praktikas kasutatavaid näiteid tuua ei ole.

(Schadt jt., 2010)

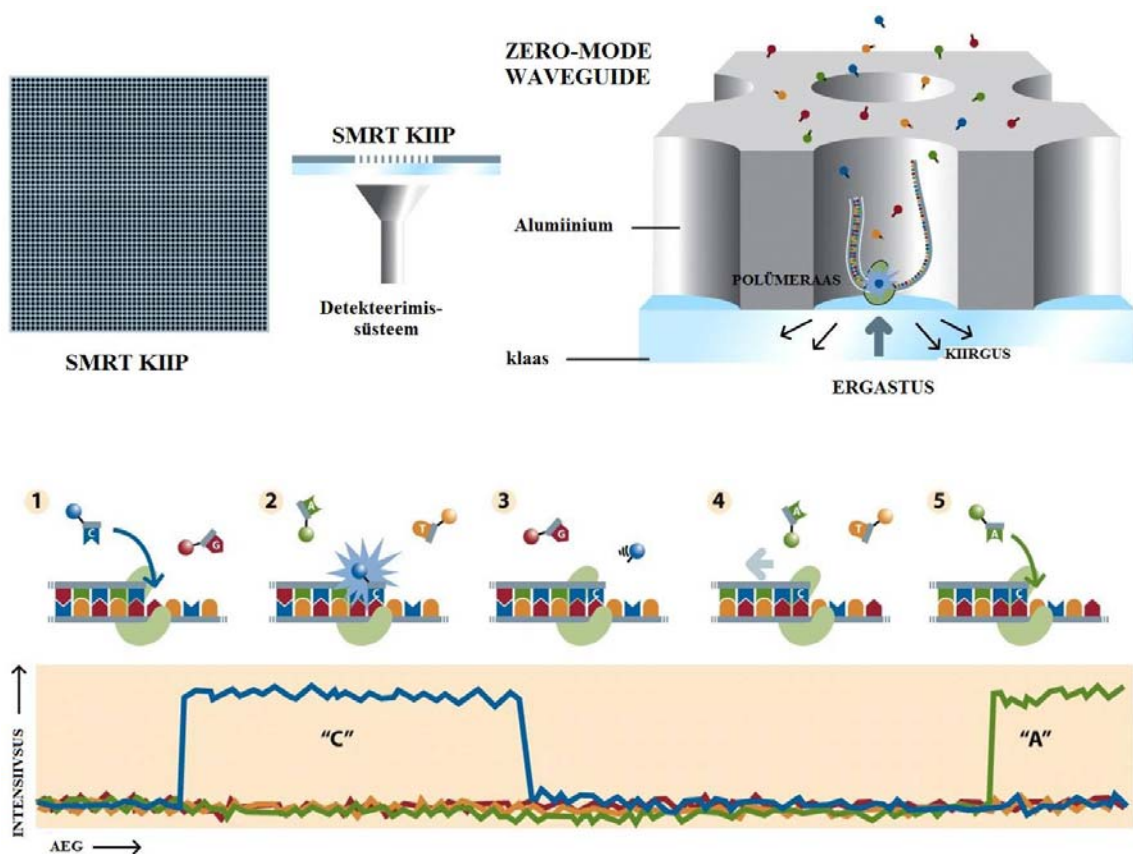
4.1 Sünteesi kaudu sekveneerimine

Üksikmolekuli reaajas sekveneerimise (single-molecule real-time sequencing SMRT) meetodi töötas välja firma Pacific Biosciences (PacBio) (Menlo Park, CA, USA) 2009 aastal. SMRT sekveneerimistehnoloogia võimaldas esmakordselt vaadelda DNA polümeraasiga loomulikult teel toimivat DNA sünteesi. Tehnoloogia põhineb üksiku pidevalt ja protsessiivselt töötava DNA polümeraasi molekuli jälgimisel (Eid jt., 2009). SMRT sekveneerimise eesmärgiks oli lugeda pikki DNA lõike kiirema ajaga, anda rohkem infot konkreetse lõigu kohta ning muuta kogu protsess odavamaks. See tehnoloogia töötas ümberkujundada kogu senise sekveneerimise ning olla uueks genoomse analüüsamise paradigmaks (Schadt jt., 2010).

SMRT tehnoloogia on üles ehitatud kolmel põhilisel uuendusel, mis ületasid suuri väljakutseid DNA sekveneerimise valdkonnas:

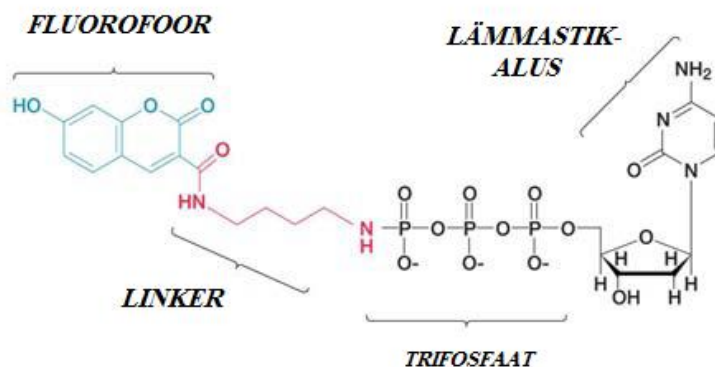
- The SMRT CELL, (kindla läbimõõduga aukudega mikrotiiterplaat) mis võimaldab reaajas jälgida individuaalsetele DNA molekulidele seonduvaid fluorofooridega konjugeeritud nukleotiidide samal ajal säilitades kõrget signaali-müra suhet.
- Fosfolingitud fluorestsentsmärkega nukleotiidid, mis võimaldavad kiire ja täpse DNA sünteesi käigus toota pikki DNA järjestusi.
- Uudne jälgimisplatvorm, mis on paindlik erinevates rakendustes ning võimaldab üksikmolekulil reaajas sekveneerida (Schadt jt., 2010).

DNA sekveneerimist teostatakse SMRT Cell'is, mis sisaldab tuhandeid Zero-Mode Waveguides (ZMWs). ZMWs on põhimõtteliselt väikesed 10nm diameetriga poorisarnased augud, mis on ümbritsetud metallist kilega ja ränidioksiidiga (Levene jt., 2003; Schadt jt., 2010). ZMW on piltlikult öeldes kui aken, mis laseb reaals-ajas jälgida DNA polümeraasi tööd sünteesi käigus. Iga kambri põhjas asub üksik DNA polümeraasi molekul, mis alaliselt täidab nukleotiidide järjestamise rolli. Nukleotiidid, mis on vastavalt oma tüübile märgistatud nelja erineva värviga fluorofooriga, asetatakse kõrges kontsentratsioonis reaktsioonilahusesse. Lahuse eesmärk on kiirendada ensüümi tööd, muuta see võimalikult täpseks ja protsessiivseks. Kuna ZMWd on väga väikesed, siis isegi kõrge kontsentratsiooniga bioloogilises lahuses paiknevad nukleotiidid väga lühikest aega. Lisaks sellele on nukleotiidid detekteerimispiirkonnas väga lühikest aega, kuna järgmine nukleotiid tuleb peale. Tulemuseks on väga madal taust (Joonis 6)(Ozsolak, 2012).



Joonis 6. SMRT tehnoloogia põhimõte. (*Human Molecular Genetics*)

Kuna DNA polümeraas ühendab komplementaarseid nukleotiide, siis iga alus paikneb detekteerimispiirkonnas ainult kümneid millisekundeid, mis on suurusjärgu võrra kauem kui kulub aega nukleotiidide difusiooniks detekteerimispiirkonda ja sellest välja. Selle aja jooksul kiirgab nukleotiidiga seondunud fluorofoor fluorestsents valgust vastavalt tuvastatud alusele. Pärast seda lõhub polümeraas fluorofoori paigalhoidva sideme ning värv liigub detekteerimispiirkonnast minema. Erinevalt teistest tehnoloogiatest on fluorestsents värv seotud fosfaadi ahela külge mitte aga lämmastikalusele endale (Joonis 7). Sünteesi loomuliku osana lõigatakse fosfaatrühm (pürofosfaat) lahti kui nukleotiid liitub DNA ahelaga. Pärast nii fosfaatrühma kui ka värvi eemaldumist, jääb järgi tavaline DNA ahel, millel pole mingeid märke eelnevast märgistusest (Ozsolak, 2012).



Joonis 7. Fluorofoor fosfaatrühma küljes. (www.pacificbiosciences.com)

DNA püolümeraas on võimeline sünteesima katkestusteta ja takistusteta mitmeid aluseid sekundis. Sellisel viisil saadakse pikk DNA ahel vaid mõne minutiga. Selline sekveneerimine leiab reaalajas aset kõigis tuhandetes ZMW-des üle terve SMRT plaadi. PacBio teadlased on demonstreerinud, et uus tehnoloogia on võimeline sünteesima tuhandete aluspaaride pikkuseid järjestusi.

Lihtsustatud proovide ettevalmistamine ja amplifikatsiooni elimineerimine võimaldab genereerida täpsemaid järjestusi, mis on ideaalseks rakenduseks diagnostikas ja erinevates kliinilistes rakendustes (Thompson ja Milos, 2011).

Pacific Biosciences'i üksikmolekuli reaalajas sekveneerimise tehnoloogia on tänapäeval laialdaselt kasutusel. Mõned aastad tagasi oli see masin jäänud tahaplaanile oma madala läbilaskevõime tõttu võrreldes teise põlvkonna masinatega nagu Illumina ja Ion Torrent. Samuti levisid kuulujutud, et PacBio teeb väga palju vigu ja pole usaldusväärne. Praeguseks on tõestatud, et masin on suhteliselt täpne ja tal on väga palju eeliseid väikeste genoomide sekveneerimisel. Samuti on palju räägitud tema võimest tuvastada DNA modifitseeritud aluseid (Thompson ja Milos, 2011).

PacBio arendas välja tehnoloogia, mis genereerib võrreldes teise põlvkonna masinatega pikemaid DNA lõike ning tänu amplifikatsiooni puudumisele ka usaldusväärsemaid (vähem vigu). Masin suudab näidata, kus paiknevad DNA metüleeritud alused ning anda sellega informatsiooni DNA metüültransferaasi töö kohta. Keskmise PacBio

poolt väljastatavate järjestuste pikkus on umbes 3000 aluspaari pikad, kuid need võivad ulatuda ka 20 000 aluspaarini. Laias laastus võib öelda, et need on 30 kuni 200 korda pikemate järjestustega ahelad kui seda olid teise põlvkonna masinate sekventsidsid. Samuti on masina töövõime paranenud neli korda pärast oma esmakordset turule tulekut kaks aastat tagasi (Roberts jt., 2013).

4.1.1 PacBio esimene de novo eukariöodi genoom

Käesoleva aasta alguses õnnestus teadlastel sekveneerida ja *de novo* kokku panna hariliku äädikakärbsse *Drosophila melanogaster* genoom. Kogu protsessi tegi erakordseks see, et kasutati ainult PacBio tehnoloogiat. *Drosophila* genoomi suuruseks saadi 220 miljonit aluspaari, mis sekveneeriti kuue päevaga, kasutades selleks 42 SMRT plaati 90-kordse katvusega ja saadi keskmiseks lugemi pikkuseks 10 tuhat aluspaari. Seejärel kasutati Celera assemblerit ja pandi kogu genoom kokku. Kogu protsess, alates proovide ettevalmistusest ning lõpetades täieliku kokkupanekuga, võttis aega kuus nädalat. Varasemalt on teadlased töötanud 10 aastat sama genoomi kallal. Selleks kasutati aga mitmeid erinevaid tehnoloogiaid – Sangeri sekveneerimine, BAC kloonid (bakteri kunstlikud kromosoomid) ja teised mahukad laboriprotsessid. Ent kasutades ainult ühte kolmanda põlvkonna sekveneerimismasinat, PacBio tehnoloogia oli võimeline kokku panema probleemseid genoomi alasid, nt heterokromatiinid ja Y kromosoom. PacBio suutis kindlaks teha korduvaid järjestusi, mida teised masinad ei suutnud tuvastada (Heger, 2014).

4.1.2 SMRT tehnoloogia eelised ja puudused

SMRT tehnoloogia vajab protsessi teostamiseks minimaalses koguses reagente ning eelnevaid proovide ettevalmistamist. Samuti puudub selles aeganõudev pesemise ja skanneerimise etapp, mis võimaldab tervet protseduuri teostada minutitega (Eid jt., 2009). Nagu eespool mainitud ei vaja SMRT sekveneerimine rutiinset PCRi amplifikatsiooni, mis aga enamikel teise põlvkonna masinatel oli hädavajalik. Selle tulemusena jäävad ära kõik võimalikud vead ja deletsioonid, mis muudavad kogu PacBio tehnoloogia usaldusväärsemaks. Kuna DNA polümeraasi protsessiivsus on nii suur, siis genereeritakse ka pikemaid ahelaid.

Keskmine lugem on umbes 1000-3000 aluspaari pikk ning maksimaalselt võib pikkus pürgida 20 000 aluspaarini, mis võimaldab de novo assambleerimist, haplotüüpide otsest detekteerimist ja isegi tervete kromosoomide kokkupanekut.

Teise põlvkonna proovide ettevalmistamine nõudis tihtipeale kalleid lisavarustusi, erinevaid reagente kui ka lisaruumi. Kogu eeltöö võis võtta mitu päeva lisaaega. See-eest SMRT sekveneerimine vajab eeltööna kõigest DNA fragmenteerimist vajaliku suurusega tükkideks, otsade tõmbistamist ning adaptorite ligeerimist. Eeltöö lihtsus tagab suure paindlikkuse masina erinevateks rakendusteks (Travers jt., 2010).

SMRT sekveneerimisel on veel üks huvitav tunnus. Nimelt on see võimeline jälgima ja detekteerima kineetilist informatsiooni. Reaalajas DNA polümeraasi aktiivsuse jälgimine andmete kogumiseks, mõõtmiseks kui ka hindamiseks ja ensümaatilise reaktsiooni toimumiseaeg väljendavad keemilist kineetikat. SMRT sekveneerimisprotsessis, jälgides muutusi kineetikas võib kindlaks teha kui mingi alus on läbinud modifikatsiooni, nt metülatiooni. Selleks ei pea tegema mingit lisatööd, lihtsalt koguda tavapärasest sekveneerimisinfot (Flusberg jt., 2010).

Lisaks DNA sekveneerimisele on SMRT masin paindlik ka teistele rakendustele. Näiteks võib tuua hiljuti avaldatud rakenduse, kus SMRT tehnoloogia abil jälgiti reaalajas ribosoomi kui see teostas translatsiooni. Samuti usutakse, et on võimalik otseselt jälgida ka teisi ensüüme, nagu näiteks RNA sõltuvat polümeraasi ja pöördtranskriptaase RNA sekveneerimiseks (Uemura jt., 2010).

Vaatamata kõigile nendele eelistele on SMRT sekveneerimisel ka rida puudusi, mis vajavad täiustumist. Nagu ka Helicose masinal võib vigade määr ulatuda üle 5%. Kõige rohkem tekib vigu nukleotiidide insertioonide ja deletsioonidega, mis on määravaks nii sekvensi kui ka terve genoomi kokkupanemisel. Lisaks sellele ei vasta kogu läbilaskevõime sellele, mida on võimalik saavutada teise põlvkonna masinatega. SMRT masina läbilaskevõime määrab ZMWde arv, mis paralleelselt ühe korraga loevad geneetilist informatsiooni. Kuigi algupäraselt lubati väga suurt arvu korraga töötavatest ZMW-dest, siis esialgses masinas oli kõigest 75 000 ZMWd.

Lõpuks, probleem mida ennustati suureks kolmanda põlvkonna tehnoloogiate puhul, oli andmete suur erinevus teise põlvkonna masinate kogutud andmetest. Kuigi SMRT andmed annavad palju lisainfot nukleotiidide keemia ja struktuuri kohta, on need andmed täiesti teises formaadis ja omavahel võrdlemine on äärmiselt keeruline (Schadt jt., 2010).

4.2 DNA sekveneerimine nanopooridega

Nanopoor on pisike biopoor, mille läbimõõt on paar nanomeetrit. Enamik nanopooridega sekveneerimistehnoloogiad põhinevad DNA molekuli või selle komponentide poori läbimisel, mis detekteerivad üksikuid nukleotiide elektrilaengu või optilise signaali kaudu. Kuna see tehnoloogia kasutab DNA üksikmolekule, siis juba väikses proovimassi muutuse kaudu saab sekveneerida kiiresti ja lihtsalt.

Ideed kasutada nanopore biosensoritena sai alguse 1990 aastate keskel Oxfordi, Harvardi ja University of California Santa Cruz ülikoolide teadlaste poolt (www.nanoporetech.com/technology/introduction-to-nanopore-sensing/introduction-to-nanopore-sensing). Nende uuringud näitasid, et kui nanopoorile anda mingisugune laeng, siis tänu elektriväljale liikus üheaheelaline nukleiinhape sealt läbi. Samal ajal tuvastavad nanopoorid ionide teekonna ja laengu muutusi. Tänu sellele avastusele hakkasid teadlased eri maailma piirkondadest otsima erinevaid rakendusi, et sekveneerimine läbi nanopooride saaks võimalikuks (Ozsolak, 2012).

Aastaid püüti keskenduda optimaalsete nanopooride omaduste leidmisele, mis aitaksid DNA ahelal seda läbida ning tuvastada nukleotiide. Nanopoorid võivad olla nii bioloogilised, tehnilikust materjalist valmistatud kui ka kombineeritud mõlemast (Hall jt., 2010). Palju rõhku pandi *Staphylococcus aureus* hemolüsiinile- transmembraansele heptameerile, mis moodustab poore läbi lipiidse kaksikkihi (Howorka jt., 2001). Alfa-hemolüsiini moodustamise lihtsus ja loomulikkus ning struktuuri informatsiooni olemasolu on põhjused, miks see aine on poori jaoks sobilik. Samuti on võimalik valke muteerida, et poor saaks õigesti toimida ja reageerida nukleiinhapetega. Vahepeal uuriti ka tehnilikest materjalidest nanopore, mis olid valmistatud grafeenist ja räni nitriididest. Nende eelisteks oli näiteks säästlikum ja potentsiaalselt suurem tootmine võrreldes bioloogiliste pooridega. Samuti oli kergem kontrollida tehnilike pooride struktuuri, tihedust ja laiust (Ozsolak, 2012).

Signaalide detekteerimiseks ja edasi andmiseks kasutatakse tavaliselt elektrilist mehhanismi oma taskukohase hinna ja lihtsuse tõttu. On olnud masinaid, kus kasutatakse ka optilist signaalide vastuvõtjat (Ozsolak, 2012).

Nanopooride disainimisel sai suureks mureks kiirus, millega uuritav DNA läbis antud poori. See on probleemiks seetõttu, et kui DNA liigub läbi poori liialt kiiresti, siis on raske

identifitseerida üksikuid nukleotiide. Seda saab kontrollida mitmel erineval moel. Üheks mooduseks on muuta lahuse viskoossust ja soolade kontsentratsioone. Samuti saab muuta poori keemilist koostist ja kasutada polümeraase või eksonukleaase, et otse viia valitud ahel läbi nanopoori. Teadlased koostöös Oxford Nanopores Technologies-i firmaga kasutasid polümeraase, mis ühest küljest muutsid DNA üheaahelaliseks ja samas pidurdasid selle liikumiskiirust läbi poori (Lieberman jt., 2010). Vaatamata sellele oli kiirus endiselt liiga suur ja ei suudetud tuvastada individuaalseid aluseid. Kasutati mitmeid strateegiaid, et kiirust vähendada. Üheaahelalisi DNA molekule üritati staatiliselt kinni püüda hemolüsiini nanopooris, kasutades selleks DNA *hairpin*'i (juuksenõela struktuur) või DNA otsa seotud valku. Mõlemad olid liiga suured, et üldse poori siseneda. See võimaldas detekteerida üksiknukleotiidide mutatsioone immobiliseeritud DNAs. Teisisõnu hemolüsiin modifitseeriti nii, et see sisaldaks tsüklodekstriini ringe, mis seob vabu mononukleotiide. Sellisel juhul asuvad nukleotiidid pooris piisavalt kaua (kuni 10 ms), et elektrivoolu abil ära tunda vastavalt nelja erinevat alust. Teadlased avastasid ka, et phi29 faagi DNA polümeraas oli potentsiaalselt sobilik nanopooridega sekveneerimiseks, kuna see jäi DNAGA seotuks isegi selle suure pinge juures, millega DNA poori suruti. Polümeraas, mis sünteesib DNAd kiirusel üks nukleotiid iga kümne millisekundi kohta või aeglasemalt, vähendab DNA läbimise kiirust poorist neli korda võrreldes vabalt liikuva DNAGA (Schneider ja Dekker, 2012).

Nanopooride tehnoloogia pakub nii teise kui ka kolmanda põlvkonna sekveneerimistehnoloogiatele suurt konkurentsi, kuna kogu protsessi tarbeks läheb väga vähe geneetilist materjali, ilma, et seda oleks vaja kuidagimoodi modifitseerida. Samuti on nanopooridega sekveneerimisel suur läbilaskevõime ning selleks kulub minimaalselt aega ja rahalisi ressursse. Eeliseks on ka see, et nanopooridega sekveneerimine ei vaja mingit DNA sünteesi protsessi – DNA ahela järjestuse info saadakse otse ning ühte nanopoori saab kasutada mitu korda (Branton jt., 2008; Ozsolak, 2012).

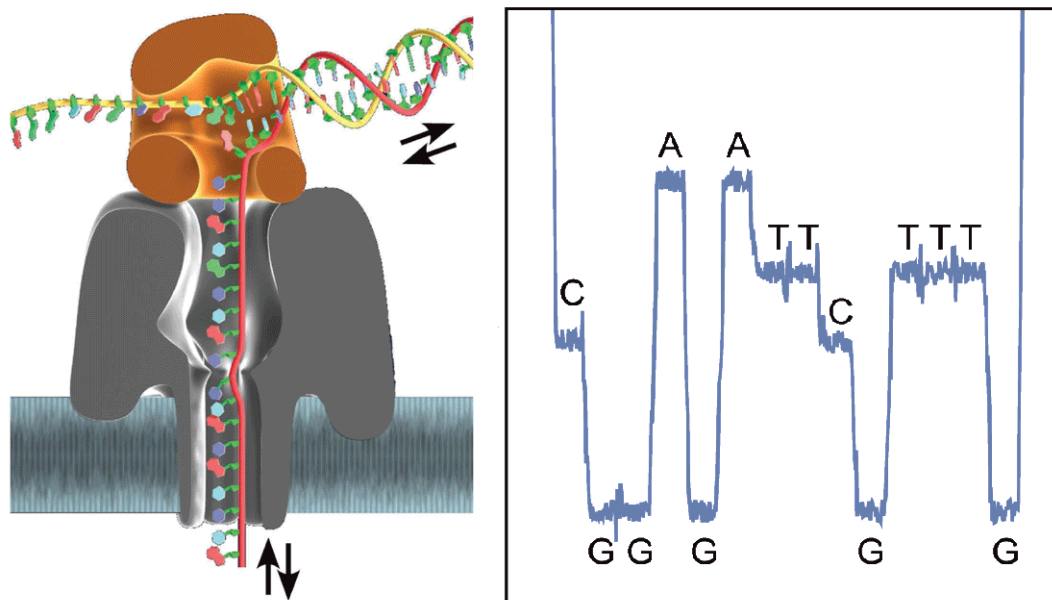
4.2.1 Oxford Nanopore Technologies

Firma Oxford Nanopore Technologies (Oxford, UK) loodi 2005 aastal, et muuta akadeemiline nanopooride uurimistöö turunduslikuks elektronipõhiseks sekveneerimistehnoloogiaks. Firma arendab nanopoori põhiseid kolmanda põlvkonna süsteeme, et

analüüsida üksikmolekule, nende hulgas siis DNAd, RNAd ja valke (www.nanoporetech.com).

2012 aasta alguses kuulutas firma Oxford Nanopore uhkelt välja kaks uut sekveneerimismasinat. Erilist tähelepanu pälvis MinION, pisike masin, mida võib USBna lülitada arvutisse ning mis mahub vabalt peopessa ära. Teine oli GridION, mis töötas samal põhimõttel eelnevaga, kuid oli kõvasti mahukam ja suurem (Yirka, 2012).

Oxford Nanopore tehnoloogias on nanopoor sisestatud sünteetilisest materjalist valmistatud membraani. See membraan omab väga suurt elektritakistust. Molekulid, mis liiguvad läbi poori põhjustavad iseloomulikke katkestusi ionivoolus. Nende katkestuste mõõtmisega saab identifitseerida vastavaid molekule. Kaheaheelise DNA puhul on see kompleksis ensüümidega, mis muudavad DNA üheaheeliseks ja suunab selle läbi nanopoori. Samal ajal tekitavad üksikud nukleotiidid või nende paarid erinevates nanopoori osades ionivoolu katkestusi, mis saadetakse andmebaasidesse. Oxfordi Nanopoori tehnoloogiaga loetakse ära mõlemad üksikud DNA ahelad, mis annab andmete analüüsimisel suure eelise (Joonis 8). Vastavalt rakendustele saab korraga kasutada 10- 10 000 nanopooriga kanalit, et saada vajalik katvus (www.nanoporetech.com/technology/the-gridion-system/movie-an-introduction-to-the-gridion-system).



Joonis 8. Oxford Nanopore Technologies nanopoorid. (Schneider ja Dekker, 2012)

Sellise tehnoloogiaga lubati korraga detekteerida palju pikemaid DNA ahelaid (kuni 100 000 alust), kaotades ära juppide kaupa eraldi sekveneerimise ja siis kokkuliitmise. Samuti lubati, et lugemite vigade arv jääb ühe protsendi ulatusse (www.genomeweb.com/sequencing/oxford-nanopore-launch-early-access-program-minion-sequencer-next-month).

Lisaks on masin suuteline teostama sekveneerimisprotsessi kiiremini kui eelmised masinad. Oxford Nanopore'i esindajad kinnitavad, et kui 20 masinat kokku ühendada, siis GridION on võimeline tervet inimese genoomi sekveneerima kõigest 15 minutiga ja 5000 dollariga (Yirka, 2012).

MinION aga töötas veel paremaid prognoose. Kõigest 900 dollariga oli võimalik erinevatest allikatest võetud proovi (näiteks verd või sülge) koheselt panna masina sisse, sisestada see arvutisse ning koheselt saada informatsiooni huvipakkuvast väikesest genoomist. Rakendusi antud masinale lubati rohkem kui ette võib kujutada (Yirka, 2012).

Alles kaks aastat hiljem, 2013 aasta lõpus kuulutas Oxford Nanopore välja programmi MinION masina varajaseks proovimiseks. Kõik valitud osalejad, kes maksid 1000 dollarit, said MinION süsteemi, mis sisaldas sekveneerivat USB seadet, flow cell-i (voolutusrakk), sensorikiipi ja vajalikku tarkvara (www.genomeweb.com/sequencing/oxford-nanopore-launch-early-access-program-minion-sequencer-next-month).

Oxford Nanopore teadlased demonstreerisid oma potentsiaalsetele klientidele uut tehnoloogiat, kuid sekveneeritavaid andmeid ei näidatud. Seda põhjendati asjaoluga, et MinION-i töökaik on nii mitmekülgne, et ei saa tagada fikseeritud sekveneerimist. See-eest tahab ettevõtte, et „uurimisrühmad“ katsetaksid ise masinaid ja avaldaksid oma saadud tulemusi. Kõigile programmile alla kirjutanud osalejatele pandi range keeld tehnoloogia detailide avaldamise kohta. Ettevõtte rõhutas, et kõik programmis osalejad saavad olla esimesed, kes avaldavad artikleid enda esimestest proovidest ja tulemustest. Samuti lisati, et edukamad teadlased saavad eeliseid GridION varajasele programmi juurdepääsule, mis on firma Oxford Nanopore-i veel avalikustamata suurem sekveneerimismasin (Karow, 2013A).

Oxford Nanopore-i firma poolt saadi valmistatud DNA proovid, bakteriofaagi lambda genereeritud DNA fragmente, mis pipeteeriti flow cell-i. Koheselt aktiveerusid nanopoorid, mis kandsid edasi informatsiooni ekraanile. Sealt oli näha, et toimus mingisugune sekveneeritud andmete vool, kuid ei õnnestunud kontrollida selle kvaliteeti. Samuti polnud eristatavad kõik neli nukleotiidi. Tulemuste kohaselt ei ole masin veel võimeline

sekveneerima algseid proove, nagu näiteks verd, vaid selleks on esmalt vaja DNAd ette valmistada (Karow, 2013A).

Flow cell-i eluiga ei ole teada, kuid seda saab kasutada mitmeid kordi. Samuti tõestati, et MinION seade on üllatavalt jõuline. Selle liigutamine ja ümberpööramine sekveneerimise ajal ei näidanud andmebaasis erilisi tagajärgi. Arvatakse, et uus tehnoloogia on väga paljutõotav, kuid see ei asenda teise põlvkonna tehnoloogiaid veel niipea (Karow, 2013A).

Esimest korda tehti juttu juba proovitud nanopoori tehnoloogiast käesoleva aasta alguses kongressil Kuala Lumpuris. Firma Oxford Nanopore on võimeline ühe korraga sekveneerima tervet bakteriofaag lambda genoomi, mis on 48 000 aluspaari pikk. Seda genoomi on ettevõtte kasutanud standardse genoomina, et täiustada MinIONi tööd.

MinION suutis sekveneerida genoome, mille keskmiseks lugemi pikkuseks oli umbes 5000 aluspaari, mõnel juhul ulatus pikkus ka 15 000 aluspaarini.

Samuti pöörati tähelepanu Oxford Nanopore sekveneerimise vigademäärale. Üldiselt esines rohkem deletsioone kui insertsioone, kuid usutakse, et vigade arvu saab vähendada, kui panna rõhku lugemite sisule, mitte nii väga pikkusele. Sekventsiga täpsust saab parandada, kasutades kahte erinevat tüüpi nanopore vastavalt süstemaatiliste vigade tüüpidele. Poori tundlikkus paranes tuhandeid kordi, kui DNA kõita ühe otsaga membraani külge. Samuti lasi see vabalt sekveneerida esialgset puutumata DNAd. Räägiti ka MinIONi pooride aktiivsusest töötamise ajal. Vastavalt katsetustele, sekveneerivad enamik poore korrektselt terve protsessi käigus ning nelja käigukorra andmed näitasid ka, et pooled kuni $\frac{3}{4}$ pooridest sekveneerivad sünkroonselt samal ajal (Karow, 2014A).

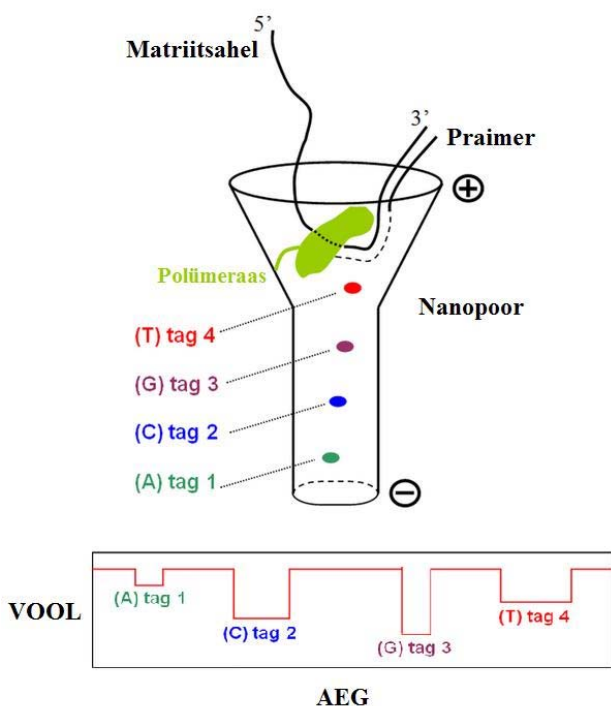
Mis puudutab GridION süsteemi, siis ettevõtte Oxford Nanopore lubab sellele nii suuremat läbilaskevõimet kui ka pooride arvu. Hetkel on GridION oma viimases arengustaadiumis ja tuleb turule pärast MinIONi (Karow, 2014A).

4.2.2 Tag Nanopore

Teadlased Columbia ja Harvardi ülikoolidest ning firmast Genia Technologies Inc., (Mountain View, CA, USA) ja Rahvuslikust Standardite ja Tehnoloogia Instituudist on teinud koostööd, et töötada välja üksikmolekuli nanopooridega sekveneerimise tehnoloogiat,

mis põhineb tag-ide kasutamisel. Eelmise aasta septembris näitas nende uurimistöö lõpuks tulemusi.

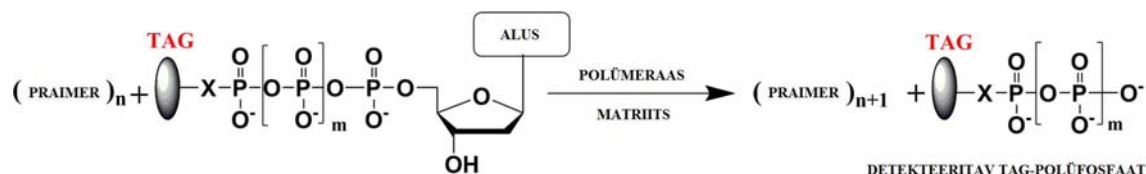
Genia Technologies, Inc.on 2009 aastal loodud eraettevõte, mis arendas välja kiibipõhiseid nanopooride detekteerimisplatvorme ning hiljem litsenseeris NanoTag-ide tehnoloogia (<http://www.geniachip.com/about>). NanoTag-idega sekveneerimine kujutab endas üksikahelalise DNA molekuli sünteesimist polümeraasi abil. Erinevalt Oxford Nanopooride tehnoloogiast on antud nukleotiidid seotud *tag*-idega (polüetüleen-glükooli molekul), mis on erineva suurusega vastavalt oma alusele. Kui tag vabaneb polümeraasi rektsiooni lõpus, siseneb see nanopoori ning tekitab katkestusi ioonide voolus (Joonis 9). Polümeraas on võimeline efektiivselt ja korrektselt ühendama nelja erineva tag-iga nukleotiidi DNAGA. Samuti tekitab iga tag iseloomuliku signaali muutuse elektrivoolus kui ta liigub läbi alfa-hemolüsiini nanopoori (Karow, 2013B).



Joonis 9. Tag nanopoor. (Kumar ja Tao, 2012)

Nüüdseks on suudetud siduda polümeraasi nanopoori külge ning alustada DNA sünteesimist kasutades selleks tagitud nukleotiide. Tehnoloogia tegi väikese muudatuse võrreldes originaalidega. Algselt oli plaanis, et polümeraas lõhub tag-i ning siis see liigub nanopoori, kus see tuvastatakse. Tegelikult aga detekteeritakse tag pooris ajal, kui see on veel nukleotiidi küljes ja polümeraas teeb oma tööd (Joonis 10). Tag püsib seal umbes 100

millisekundit, mis on piisav aeg, et see detekteerida. Pärast seda polümeraas laseb tag-ist lahti ning see tõmmatakse poorist läbi. Seega ei püüta identifitseerida liikuvat tag-i vaid immobiliseeritud paigalseisvat tag-i. Sellega hoitakse ära tagi difundeerumist (Karow, 2013B).



Joonis 10. Fosfotagitud nukleotiidialus. (Kumar ja Tao, 2012)

Samuti paranes ka soola kontsentratsiooni suhe. Algselt kritiseeriti seda, et nanopooride tööd mõõdeti kõrge soola kontsentratsiooni juures, kuid paranenud versioonis on see piisavalt madal, et polümeraas suudaks normaalselt töötada ja usaldusväärseid andmeid anda.

Hetkel töötavad teadlased selle kallal, et muuta NanoTag tehnoloogiat lihtsamaks ja paremaks. Ühest küljest on sünteetilisi tag-e lihtne disainida, kuna pole traditsioonilist lähenemist vaid saab neid katsetada ja nendega mängida. Samas aga peab tag-idel olema kindel pikkus, optilised keemilised omadused ning sobivus õige nukleotiidiga.

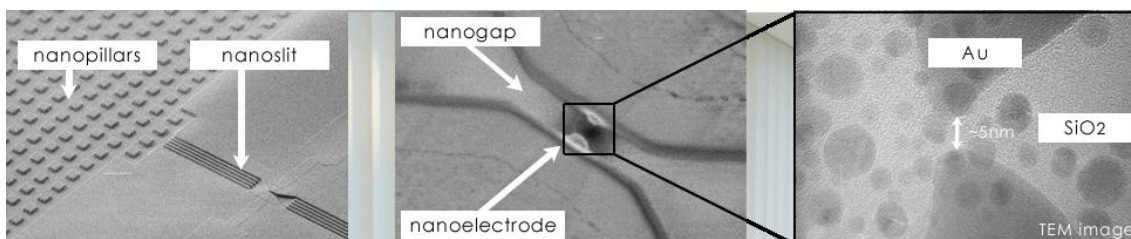
Firma Genia ja selle koostööpartnerid ei ole veel avalikult esitlenud uue NanoTag tehnoloogia abil saadud sekveneerimisandmeid. Neil on esialgsed üksiknukleotiidi eristused olemas, kuid täpseid DNA järjestusi ei saa veel öelda. Ideaalis peavad NanoTag masinad suutma mõõta nukleotiidide ühildumise kineetikat ning kasutama seda informatsiooni DNA modifikatsioonide tuvastamiseks, sarnaselt Pacific Biosciences'i platvormidele, mis suudavad detekteerida metülatsioone kineetilise informatsioonist. Hetkel pole aga veel selle kallal tööd alustatud. Kuigi NanoTag tehnoloogia vajab polümeraasi tööd ning tag-itud nukleotiide, usutakse ikkagi, et tal on eeliseid firma Oxford Nanopore Technologies ees, mis sekveneerib ahelat otse. Nimelt suuri täge on palju lihtsam detekteerida kui pooris olevat DNAd, milles mitu väikest nukleotiidi alust võistlevad omavahel. Samuti vähendavad tag-id difusiooni kiirust (Kumar ja Tao, 2012; Karow, 2013B).

Firma Genia plaanib esimese NanoTag masina tuua turule 2014 aasta lõpus. Lubatakse, et masina hind saab olema madalam kui teistel hetkel turul olevatel sekveneerimismasinateel. Samuti pakub masin konkurentsi oma lihtsa kasutamise, vähese ettevalmistamise, ja lugemite pikkusega (Karow, 2013B).

2013 aasta septembris võitsid antud teemaga seotud uurimisgrupid 5.25 miljoni dollari suuruse USA Riikliku Inimgenoomi Uuringute Instituudi (National Human Genome Research Institute - NHGRI) poolt välja pandud uurimistoetuse, et arendada uudset integreeritud süsteemi üksikahelalise DNA reaajas sekveneerimiseks. Antud grant oli suurim, mida NHGRI on välja andnud, et toetada uuendusliku tehnoloogia arendamist. Eesmärk on oluliselt vähendada DNA sekveneerimise kulusid, et individuaalse genoomi sekveneerimine saaks rutiinseks osaks meditsiinilistes uuringutes ja tervishoius. Tänu NHGRI rahalisele toetusele, loodab firma Genia luua sellise miniatuurse üheaheelalise DNA sekveneerimistehnoloogia, mis lõpuks võimaldab tervet inimese genoomi sekveneerida kõiges 100 dollariga (Evarts, 2013).

4.2.3 Quantum Biosystems

Kvanttuuma tehnoloogia põhineb kahe nanoelektroodi töö, mis on teineteisest eraldatud sub-nanomeetrilise lõhega, läbi mille jookseb elektrivool. See vool tuvastab muutusi kui üheaheelaline DNA või RNA liigub läbi lõhe (Joonis 11)



Joonis 11. Quantum Biosystems tehnoloogia. (<http://www.quantumbiosystems.com>)

Quantum Biosystems on Jaapani firma, mis loodi 2013 aasta alguses Osaka linnas (www.quantumbiosystems.com). Oma esimest üksikahela algelist sekventsi esiteleti käesoleval aastal konverentsil Californias. Hetkel on Quantum täiendavate rahavõimaluste otsingul ning plaanis on juba sel aastal alustada nende masina varajase juurdepääsu programmi. Firma eesmärgiks hetkel on liikuda Jaapanist välja, otsida sealt andekaid teadlasi kui ka lisa rahastamisvõimalusi (Karow, 2014B).

Quantum litsenseeris tehnoloogia, milles analüüsitakse tunneli voolu, et tuvastada nukleotiidualuseid. Samuti süsteemi, mis kontrollib DNA liikumise kiirust läbi nanopoori ning „nanosambaid“, mille ülesandeks on üheaahelalise DNA lahti „venitamine“. Lisaks sellel arendab ettevõtte välja nano-räni seadet, et vähendada müra.

Hetkel toodab Quantum Biosystems nanoelektroode. Kasutades seda mehaaniliselt kontrollitud sõlme on võimalik saada korralikke lugemeid. Teadlased näitasid, et vooluga pilus on võimalik eristada nelja erinevat DNA ja RNA alust. Samuti on antud tehnoloogiaga võimalik uuesti järjestada trinukleotiide ning koostada natuke suuremate oligonukleotiidide järjestusi.

Vaatamata sellele, et DNA aluseid sai detekteerida nukleotiidi täpsusega, jäi probleemiks DNA kontrollimatu liikumine ümber nanoelektroodide. See takistas täpsete lugemite genereerimist ning tehnoloogia tundus kasutuna. Probleemile leiti lahendus, kasutades elektroforeesi, et kontrollida DNA liikumist.

Endiselt on suureks probleemiks DNA kontrollimatu liikumine läbi nanopilu. Nimelt ei osata suunata tavalist üheaahelalist DNA molekuli, mis on umbes 1 nanomeeter lai, läbi pisikese pilu. Arvatakse, et alguses tuleb luua lõhe suurusega 0.5 nanomeetrit kuni on näha kvaliteetset signaali, mis tavaliselt esineb 0.8 nanomeetri juures. Samuti võib esineda olukord, kui DNA liigub elektroodidest väga lähedalt mööda, aga mitte läbi pilu. Vaatamata sellele, tekitab see ikka voolu pilus. Käesoleva tehnoloogiaga on võimalik integreerida kümneid kanaleid ning ei ole näha piiranguid, mis takistaks integreerida ka tuhandeid kanaleid (Karow, 2014B).

Quantum Systems otsustas näidata oma sekveneerimisandmeid varakult, et anda teadlastel võimalust neid hinnata, erinevalt firmast Oxford Nanopore Technologies, kes pole siiani avalikustanud oma tulemusi. Hetkel on Quantum Systems tehnoloogia võimeline sekveneerima bakteriofaag phiX 174 genoomi, mida kasutatakse test genoomina ja mis on 54 000 aluspaari pikk.

Ettevõtte eesmärk on luua masinaid, mis genereerivad ahelaid pikkusega sada miljardit alust tunnis ning mille sekveneerimiskvaliteet ei lange lugemi pikkuse suurenemisega. Samuti loodetakse pakkuda konkurentsi turulolevate tehnoloogiatele. Tulevikus plaanitakse panna rõhku metülatsiooni detekteerimise ja otseselt RNA sekveneerimisele. Hetkel pole veel masina turuletuleku aega teada (Karow, 2014B).

ARUTELU

Esimene inimese genoomi sekveneerimine võttis aega kolmteist aastat ja selle peale kulus üle 3 miljardi dollari (Schadt jt., 2010). See oli suureks läbimurdeks kogu teaduses. Kuigi Inimese Genoomi Projekt (HGP, *Human Genome Project*) võttis eeldatavast vähem aega, hakati ikka otsima uusi tehnoloogiaid, mis muudaksid sekveneerimisprotsessi kiiremaks ja odavamaks. Tänapäeval on publikatsioonides avaldatud palju uusi tehnoloogiaid, millest kahjuks enamus töötab vaid nende uurijate endi käes. Samas on ka mitmeid tehnoloogiaid, mis ei ole veel reaalselt turule jõudnud.

Esimese põlvkonna sekveneerimine on kõige vanem tehnoloogia ja seda kasutatakse endiselt väga laialdaselt ka tänapäeval. Vaatamata aeganõudvale proovide ettevalmistamisele leidub selle rakendusi kõikjal teaduses ja meditsiinis. Teise põlvkonna tehnoloogiad erinesid esimesest väga palju. Siin pandi rõhku paralleelselt sekveneerimisele, milles kasutati fragmenteeritud DNA raamatukogusid. Nagu ka Sangeri meetodi puhul, kasutatakse PCR-i abil DNA paljundamist. Eesmärgiks oli saada pikki DNA fragmente, kuid lõpuks osutusid järjestused palju lühemaks kui esimese põlvkonna tehnoloogial. Sangeri 800 nukleotiidi pikkustest järjestustest said 25-400 nukleotiidi pikkused järjestused. Teise põlvkonna tehnoloogias kasutati põhiliselt pesemis- ja skaneerimismeetodit. Põhiliselt kasutatakse fluorestsentsmärkeid ja nende detekteerimist. Kuna PCRi amplifikatsioon oli vajalik, siis arvatavasti tekkis ka palju vigu, mis tõstavad sekveneerimisprotsessi vigade arvu. Vaatamata sellele tundub hetkel turuliider olevat Illumina platvorm, millel on küllaltki suur läbilaskevõime ning hetkel parim hinna ja kvaliteedi suhe teise põlvkonna platvormide võrdluses. Kahe põlvkonna vahele liigitati veel kaks tehnoloogiat, millest suuremat huvi pakub firma Life Technologies poolt välja töötatud Ion Torrent. Antud tehnoloogial puudub võrreldes eelnevatega kulukas fluorestsentsmärgiste kasutamine, mis muudab sekveneerimisprotsessi tunduvalt lihtsamaks. Tehnoloogiat ei liigitata päris kolmanda põlvkonna alla, kuna PCR ja pesu oli endiselt vajalik. Antud tehnoloogia põhimõte tundub olevat kõige lihtsam, kuna detekteeritakse nukleotiidide ühinemisel vabanevat vesinikku, mis muudab „augu“ pH-d. Kõige keerulisem selle juures on ehitada tilluke pH-meeter, mis asub igas augus ja tuvastab ühinenud nukleotiidi.

Kolmanda põlvkonna sekveneerimistehnoloogia põhineb üksikmolekulide reaajas sekveneerimisel, mis on võrreldes varasemaga täiesti teistsugune lähenemine. Kahjuks on reaalselt turule jõudnud ainult Pacific Biosciences-i poolt väljatöötatud tehnoloogia. Antud tehnoloogiaga saab sekveneerida kuni 3000 nukleotiidi pikkuseid järjestusi, mis on kõvasti

pikemad kui eelnevatel põlvkondadel. Lisaks sellele puudub igasugune amplifitseerimine ning proovide ettevalmistamine võtab vähe aega. Võib arvata, et tänu PCR-i puudumisele esineb antud tehnoloogias vähem vigu ja sekventsidsid on usaldusväärsemad. Arvatavasti on uuel tehnoloogial ka keeruline andmete töötlus, kuna korraga saadakse väga suures mahus informatsiooni. Samuti kuna antud tehnoloogia erineb kõvasti varasematest, ei saa hästi kontrollida ega võrrelda andmeid eelnevate generatsioonidega. Kuigi sekveneeritava proovi ettevalmistamine ei nõua palju tööd, siis näiteks erinevate nukleotiidide märgistamine vajab küll natuke vaeva ja aega. Üldiselt võib öelda, et PacBio tehnoloogia vastab oma esialgsetele planeeritud lubadustele.

Kolmanda põlvkonna tehnoloogiate hulka jääb terve rida erinevaid nanopooridega sekveneerimise meetodeid, mis veel pole reaalselt turule jõudnud. Nende puhul saab võrrelda ainult toodetud firmade enda andmete analüüse ja platvormide töö prognoose. Kõigi nende tehnoloogiate põhimõte on praktiliselt sama – üritatakse viia üksik DNA ahel läbi defineeritud suurusega augu või pilu, et detekteerida nukleotiidide poolt tekitatud katkestusi ioonvoolus. Firma Oxford Nanopore oli esimene, kes hakkas kuulutama oma „veel mitte toodetud“ masinaid, mis lubasid ulmelisi tulemusi. Koheselt lubati, et masinal MinION ja GridIONil on ees suur tulevik pea kõigis teadusvaldkondades. Paar aastat pärast välja kuulutamist hakatigi huvilistele oma algelisi masinaid reklaamima ja proovima andma. Imelik oli see, et ei olnud ette näidata mingisuguseid tulemusi vaid loodeti teadlaste abile väljaspool ettevõtet. Praeguse hetkeni pole firma progressist midagi kuulda. Vaatamata sellele, kui nüüd MinION platvormid kunagi turule jõuavad, pakuvad nad suurt konkurentsi teistele tehnoloogiatele. Nimelt pisike masin on USB-suurune ja lubab erinevatest allikatest võetud proovi koheselt modifitseerimata sekveneerida. Masina kvaliteeti ja selle lubadusi saab aga kontrollida alles siis, kui see turule peaks jõudma. See-eest NanoTag tehnoloogia, mida tutvustati kirjastusallikates tundub loogilisem ja reaalsem. Selle masinaid pole samuti turule jõudnud kuid selle esitlemine firma Genia poolt jättis palju parema mulje. NanoTag tehnoloogia kujutab endast erineva suurusega polüetüleen-glükooli molekulidega märgistatud DNA sekveneerimist, mida nanopoorid suudavad paremini tuvastada kui üksikuid väikeseid nukleotiide. Tagide valmistamine nõuab küll lisatööd ja aega, kuid siiski tundub see firma Oxford Nanopore tehnoloogiast paljutõotavam ning täpsem. Seda tõestab ka asjaolu, et 2013 aastal andis NHGRI välja 5.2 miljoni dollari suuruse rahalise toetuse tag nanopooride tehnoloogia arendamiseks. Antud tehnoloogias nähakse kõige suuremat potentsiaali, et tulevikus muuta individuaalse genoomi sekveneerimist rutiinseks protsessiks. Jaapanlaste Quantum Biosystems-i tehnoloogia on samuti veel arengujärgus, kuid erinevalt teistest

nanopooride meetoditest, liigub selles DNA läbi tillukese nanopilu. Ettevõtte on küllaltki väike ja uus ning sellest on avaldatud vähe artikleid. Raharessursside puudumine ja hulgalised esinevad probleemid antud tehnoloogias, muudavad selle teisejärguliseks. Võibolla kui konkreetse tehnoloogiaga masin jõuab turule, siis pakub see suuremat konkurentsi teistele eksisteerivatele meetoditele, kuid hetkel on kõik väga algeline.

Kindlasti on kolmanda põlvkonna tehnoloogiate meetodid erakordsed ja paljulubavad, kuid pigem on tegu jutuga kui tegudega. Masinad, PacBio ja Ion Torrent, mis on turule jõudnud näitavad häid tulemusi, kuid vajavad endiselt lihvimist. Kindlasti pakuvad neile suurt konkurentsi nanopooride tehnoloogiad, mis tulevad odavamad kui eelmised tehnoloogiad, kuid millal see juhtub, ei ole teada (Rusk, 2009). Igal tehnoloogial on omad eelised ja puudused, kuid veel pole seda üht universaalset masinat, mis oleks hea kõigis vaatenurkades. Printeri leiutamise ega ei visanud inimesed pliiatseid ja pabereid minema, täpselt samamoodi ei tasuks uute peente tehnoloogiate pealetulekuga unustada vanu usaldusväärseid tehnoloogiaid, nagu selleks on Sanger ja Illumina.

KOKKUVÕTE

Peaaegu 40 aastat on möödas DNA primaarstruktuuri esmase järjestamistehnoloogia välja töötamisest. Sellest ajast peale on tehnoloogiad läbinud ulatusliku arengu ning täiustamise. Prooviti ära erinevaid lähenemisi, et muuta kogu protsess kiiremaks, odavamaks ning usaldusväärsemaks. Kolmanda põlvkonna sekveneerimistehnoloogias keskendutakse reaalajas DNA üksikmolekuli järjestamisele, mis varasematest meetoditest on kõige lihtsama proovide ettevalmistamisega ja ka võimaldab sekveneerida pikemaid ahelaid. Väga paljud antud põlvkonna tehnoloogiad on veel arengujärgus ning nende masinaid pole veel turule jõudnud. Vaatamata sellele, paari aasta pärast, kui kõik tehnoloogiad saavad teostatuks, võib saada võimalikuks, et inimese genoomi saab sekveneerida paari tunniga ja kõigest 100 dollariga.

Käesoleva bakalaureusetöö kirjanduse ülevaate esimeses pooles tutvustasin lühidalt esimese ja teise põlvkonna sekveneerimistehnoloogiaid, mis on reaalselt turul olemas ja omavad kindlat rakendust. Teises pooles võrdlesin põhjalikult kolmanda põlvkonna sekveneerimistehnoloogiaid, nende eeliseid ja puudusi.

Kokkuvõtvalt võib öelda, et kolmanda põlvkonna sekveneerimistehnoloogiad on oma uudse lähenemisega pakkunud hulgaliselt eeliseid võrreldes varasemate põlvkonna tehnoloogiatele. Reaalajas sünteesi teel sekveneerimine võimaldab järjestada DNA ahelaid neid amplifitseerimata, kuid kasutatakse endiselt fluorestsents märgistust. Nanopooridega sekveneerimise tehnoloogia ei vaja samuti PCR-i ning nukleotiide detekteeritakse otse, lugedes ioonvoolu katkestusi. Erinevalt SMRT tehnoloogiast pole nanopooridega sekveneerimine veel võimalik, kuna antud masinaid pole turule tulnud.

Third generation sequencing technologies

Kristiina Hein

Summary

Almost 40 years have passed since the first development of DNA primary structure sequencing technology. Since then, technologies have gone through extensive improvement and refinement. Scientists have been trying different approaches in order to make the whole process faster, cheaper and more reliable. The third generation technologies focuses on real-time DNA single molecule sequencing, which has simpler sample preparation and allows to generate longer reads compared to previous technologies. Most of this generation technologies are still under development and their platforms have not reached the market yet. Despite that, a few years from now, when all technologies have reached their potentials, it may become possible to sequence whole human genome in a few hours and only with 100 dollars.

In the first part of this Bachelor's thesis I briefly introduced first and second generations of DNA sequencing technologies, which are presently available on the market and has specific applications. In the second part I focused on the comparison of the third generation sequencing technologies, their advantages and disadvantages.

To summarize, it can be said that third generation sequencing technologies with its innovative approaches have numbers of advantages compared to previous generation ones. Real-time sequencing by synthesis allows to sequence DNA strands without their previous amplification although fluorescence labeling is still used. Sequencing with nanopores also do not require amplifications and nucleotides are detected directly by reading the ion flow interruptions. Unfortunately, none of the nanopore platforms are on the market yet and it is hard to say whether technology is possible or not.

TÄNUAVALDUSED

Kõige rohkem tänan ma oma juhendajat Ants Kurge, kelle suure abiga see lõputöö valmis sai. Samuti tänan Maret Kiviranda ja Julia Koskarit, kes Tartus elamispinda pakkusid ja motivatsiooni andsid.

KASUTATUD KIRJANDUS

Adams, J. U. (2008). DNA sequencing technologies. *Nature Education*, 1(1), 193.

Branton, D., Deamer, D.W., Marziali, A., Bayley, H., Benner, S. A., Butler, T., Ventra, M. D. et al. (2008). The potential and challenges of nanopore Sequencing. *Nature Biotechnology*, 26(10), 1146-1153.

Eid, J., Fehr, A., Gray, J., Luong, K., Lyle, J., Otto, G., Peluso, P., Rank, D., Baybayan, P., Bettman, B. (2009). Real-time DNA sequencing from single polymerase molecules. *Science*, 323, 133–138.

Evarts, H. (2013). Team Led by Professor Jingyue Ju Wins \$5.25 Million NIH Grant to Develop a New Single Molecule Electronic DNA Sequencing Platform. *Columbia Engineering*.

Flusberg, B.A., Webster, D.R., Lee, J.H., Travers, K.J., Olivares, E.C., Clark, T.A., Korlach, J., Turner, S.W. (2010). Direct detection of DNA methylation during single-molecule, real-time sequencing. *Nat. Methods*, 7, 461–465.

Hall, A. R., Scott, A., Rotem, D. (2010). Hybrid pore formation by directed insertion of alpha-haemolysin into solid-state nanopores. *Nat Nanotechnol*, 5(12), 874-877.

Harris, T.D., Buzby, P.R., Babcock, H., Beer, E., Bowers, J., Braslavsky, I., Causey, M., Colonell, J., Dimeo, J., Efcavitch, J.W. (2008). Single-molecule DNA sequencing of a viral genome. *Science*, 320, 106 - 109.

Heger, M. (2014). PacBio Demos First De Novo Animal Genome as it Plans Longer Reads, Increased Throughput. *In Sequenece*.

Hert, D.G., Fredlake, C.P., Barron, A.E. (2008). Advantages and limitations of next-generation sequencing technologies: a comparison of electrophoresis and non-electrophoresis methods. *Electrophoresis*, 29, 4618–4626.

- Howorka, S., Cheley, S., Bayley, H. (2001). Sequence-specific detection of individual DNA strands using engineered nanopores. *Nat Biotechnol*, 19(7), 636-639.
- Huang, S., Du, Y., Wang, X. (2009). Recent developments of the cucumber genome initiative—an international effort to unlock the genetic potential of an orphan crop using novel genomic technology. *Plant and Animal Genomes XVII*.
- Imelfort, M., Edwards, D. (2009). De novo sequencing of plant genomes using second-generation technologies. *Briefings in Bioinformatics*, 10(6), 609-618.
- Karow, J. (2013). Oxford Nanopore Shows off MinIon at ASHG; 'Hundreds' to be Shipped for Early-Access Program. *In Sequence*. A
- Karow, J. (2013). Team Shows Proof of Concept for Tag Nanopore Sequencing; Genia Plans Commercial Release in Late 2014. *In Sequence*. B
- Karow, J. (2014). Japan's Quantum Biosystems Shows Raw Read Data from Single-Molecule Nanogap Sequencer. *In Sequence*. B
- Karow, J. (2014). Oxford Nanopore Says 50 Kb 'Easily Obtained' from Single Reads; Addresses MinIon Error Types. *In Sequence*. A
- Kumar, S., Tao, C. Jt. (2012), PEG-Labeled Nucleotides and Nanopore Detection for Single Molecule DNA Sequencing by Synthesis. *Scientific Reports*, 684.
- Levene, M.J., Korch, J., Turner, S.W., Foquet, M., Craighead, H.G., Webb, W.W. (2003). Zero-mode waveguides for single-molecule analysis at high concentrations. *Science*, 299, 682–686.
- Lieberman, K.R., Cherf, G.M., Doody, M. J. (2010). Processive replication of single DNA molecules in a nanopore catalyzed by phi29 DNA polymerase. *J Am Chem Soc*, 132(50), 17961-17972.
- Margulies jt. (2005). Genome sequencing in microfabricated high-density picoliter reactors. *Nature*, 437(7057), 376-380.

- Margulies, M., Egholm, M., Altman, W.E. (2005). Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature*, 437, 376–80.
- Metzker, M. L. (2010). Sequencing technologies – the next generation. *Nature Reviews*, 11, 31-47.
- Natrajan, R., Reis-Filho, J. S. (2011). Next-generation sequencing applied to molecular diagnostics. *Expert Reviews*, 11(4), 425-444.
- Ozsolak, F. (2012). Third-generation sequencing techniques and applications to drug discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 7(3), 231-243.
- Pareek, C. S., Smoczynski, R., Tretyn, A. (2011). Sequencing technologies and genome sequencing. *Journal of Applied Genetics*, 52, 413–435.
- Roberts, R. J., Carneiro, M. O., Schatz, M. C. (2013). The advantages of SMRT sequencing. *Genome Biology*, 14, 405.
- Rusk, N. (2009). Cheap third-generation sequencing. *Nature Methods*, 6(4), 244-245.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 74, 5463–5467.
- Schadt, E. E., Turner, S., Kasarskis, A. (2010). A window into third-generation sequencing. *Human Molecular Genetics*, 19(2), 227-240.
- Schneider, G. F., Dekker, C. (2012). DNA sequencing with nanopores. *Nature Biotechnology*, 30(4), 326-328.
- Thompson, J. F., Milos, P. M. (2011). The properties and applications of single-molecule DNA sequencing. *Genome Biology*, 12, 217.
- Travers, K.J., Chin, C.S., Rank, D.R., Eid, J.S., Turner, S.W. (2010). A flexible and efficient template format for circular consensus sequencing and SNP detection. *Nucleic Acids Res*, 38-159.

Uemura, S., Aitken, C.E., Korlach, J., Flusberg, B.A., Turner, S.W., Puglisi, J.D. (2010). Real-time tRNA transit on single translating ribosomes at codon resolution. *Nature*, 464, 1012–1017.

Yirka, B. (2012). Oxford Nanopore announces groundbreaking GridION and MinION gene sequencers. *Phys Org*.

KASUTATUD VEEBIAADDRESSID

arup.utah.edu/education/sanger.php

www.geniachip.com

www.genomeweb.com/newsletter/sequence

www.nanoporetech.com

www.quantumbiosystems.com

www.youtube.com/watch?v=_ApDinCBt8g

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Kristiina Hein

sünnikuupäev: 26. 02.1990

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose : „Kolmanda põlvkonna sekveneerimistehnoloogiad“,

mille juhendaja on prof. Ants Kurg,

- 1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
- 1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 26.05.2014